

时血中仍以原型药物为主, 而且根据 FPIA 法测定 CsA 全血中浓度计算出的主要动力学参数和采用 HPLC 法测定计算出的参数相近⁽⁴⁾.

REFERENCES

1 Kahan BD. Individualization of cyclosporine therapy using pharmacokinetic and pharmacodynamic parameters. *Transplantation* 1985; **40** : 457

2 Napoli KL, Kahan BD. Nonselective measurement of cyclosporine for therapeutic drug monitoring by fluorescence polarization immunoassay with a sheep polyclonal antibody: II. evaluation of the whole blood methodology and comparison with an ³H tracermediated radioimmunoassay with a sheep polyclonal antibody. *Transplant Proc* 1990; **22** : 1181

3 Xia WJ, Cheng ZR. MCPKP — a microcomputer program specialized for pharmacokinetic

compartment analysis. *Acta Pharmacol Sin* 1988; **9** : 188

4 Zhou HT, Chen G. Oral cyclosporine pharmacokinetics in renal transplantation patients. *Acta Pharm Sin* 1990; **25** : 1

5 Wilms HWF, Straeten V, Lison AE. Different pharmacokinetics of cyclosporine A early and late after renal transplantation. *Transplant Proc* 1988; **20**(Suppl 2) : 481

6 Grevel J. Cyclosporine pharmacokinetics. *Transplant Proc* 1988; **20** (Suppl 2) : 428

7 Nattermann U, Steimer W, Gokel JM, Seidel D, Land W. Clinical evaluation and therapeutic range of cyclosporine A as monitored by FPIA in kidney transplantation. *Transplant Proc* 1990; **22** : 1284

8 Pesce AJ, Schroeder TJ, First MR. An evaluation of cyclosporine monitoring by nonselective fluorescence polarization immunoassay. *Transplant Proc* 1990; **22** : 1171

BIBLID: ISSN 0253-9756 中国药理学报 *Acta Pharmacologica Sinica* 1991 Nov; **12**(6) : 530-533

α-二甲胺基-环己氧基二甲基镓对红内期伯氏和约氏疟原虫超微结构的影响

严共华, 王贵杰, 李豫川 (军事医学科学院微生物流行病学研究所, 北京 100071, 中国)

Effects of α-dimethylamino-cyclohexoxyl-dimethyl gallium on ultrastructure of erythrocytic stage of *Plasmodium berghei* and *P yoelii*

YAN Gong-Hua, WANG Gui-Jie, LI Yu-Chuan (Institute of Microbiology and Epidemiology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China)

ABSTRACT The effects of α-dimethylamino-cyclohexoxyl-dimethyl gallium (DCDG), a new antimalarial drug developed in China, on the ultrastructure of murine malaria parasites *in vivo* was studied in comparison with those of chloroquine (CQ) and artemisinin (Art). All these 3 antimalarials were

administered *ig* to mice at dosages of 1-3, 40-80, and 200-400 mg · kg⁻¹ for DCDG, CQ, and Art respectively, based on a similar intensity of morphological changes in the parasites. Blood samples were collected for electron microscopy from 15 min to 48 h after medication. The results showed that DCDG killed the malaria parasites (both asexual and sexual forms) rapidly. The most prominent changes in DCDG-treated parasites were serious dilation of perinuclear space, endoplasmic reticulum, mitochondrion and some other vesicles or intermembranous spaces. These led to the formation of large autophagic vacuoles containing some membranous materials, which were subsequently extruded. Then the parasite cells became more concentrated, finally pyknotic and died. The mode of action was very different from that of CQ and Art.

Received 1990 Jul 23

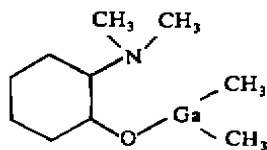
Accepted 1991 Jun 1

KEY WORDS α -dimethylamino-cyclohexoxyl-dimethyl gallium; *Plasmodium berghei*; *Plasmodium yoelii*; chloroquine; artemisinin; electron microscopy

提要 感染伯氏和约氏疟原虫的小鼠分别 ig α -二甲氨基-环己氧基二甲基镓(DCDG) $1-3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$; 氯喹 $40-80 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$; 青蒿素 $200-400 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$; 给药后 15 min 至 48 h, 多次采血样作电镜观察。结果表明, DCDG 能迅速引起疟原虫核周隙、内质网和线粒体等超微结构明显肿大, 形成以水性成分为主的泡体, 并向外排出, 导致疟原虫脱水, 固缩而死亡。其作用方式与氯喹、青蒿素不同。

关键词 α -二甲氨基-环己氧基二甲基镓; 伯氏疟原虫; 约氏疟原虫; 氯喹; 青蒿素; 电子显微镜检查

环己氧镓, 化学名 α -二甲氨基-环己氧基二甲基镓(DCDG), 是本所和东北制药厂联合研制成功的新型抗疟药, 对猴、鼠和人类疟疾均有良好的治疗效果(待发表资料)。本文用电镜观察了环己氧镓对疟原虫超微结构的影响, 以探讨其杀伤疟原虫的作用方式及其与氯喹和青蒿素等抗疟药的异同。



α -Dimethylamino-cyclohexoxyl dimethyl gallium

MATERIALS AND METHODS

药品 环己氧镓(DCDG), 沈阳东北制药厂出品, 白色结晶, 纯度 99% 以上。磷酸氯喹(CQ), 上海中州制药厂出品, 盐碱比等于 1.613:1。青蒿素(Art), 桂林制药厂出品, 纯结晶。临用前, 用去离子水将 DCDG 和 CQ 配成溶液, Art 则配成混悬液(需加约每毫升 1 滴 5% Tween 80 溶液研磨)。

小鼠 本院动物中心繁殖之昆明株瑞士小鼠, 体重 $20.5 \pm 1.5 \text{ g}$, 外观健康活泼, 血

检无寄生虫感染。

疟原虫 1 伯氏疟原虫(*Plasmodium berghei* NK65); 2 约氏疟原虫(*Plasmodium yoelii* BY 265), 均引自法国自然博物馆。本所疟疾室提供虫种, 本实验室用小鼠传代保存。

方法 实验分 3 组: 1 DCDG; 2 药物对照(分 CQ 和 Art 两组); 3 空白对照(包括给药前对照)。参照效价实验资料和预备实验中疟原虫超微结构变化的轻重程度设置不同的剂量: DCDG 1, 2, $3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$; CQ 40, $80 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$; Art 200, $400 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。将小鼠随机分组后, ip 接种 10^8 个已感染了疟原虫的 RBC(每种药物均试两种疟原虫), 约 3 d, 小鼠的 RBC 疟原虫感染率可达 20-30%。此时, 采尾血一次, 作为给药前对照。ig 药物后(空白对照只给去离子水) 15, 30 min, 1, 2, 4, 8, 12, 24, 48 h 各采血样一次, 双份, 一份涂片, 经 Giemsa 染色后, 光镜检查。另一份样品用 3% 戊二醛前固定 1 h, 1% 四氧化钨后固定 1 h; 50-100% 乙醇系列浓度脱水; Epon 812 包埋。LKB 超薄切片机切片, 经醋酸氧铀和枸橼酸铅双重染色后, 用 JEM 6C 和 EM 400T 电子显微镜作观察。

RESULTS

1 给药前和空白对照 伯氏和约氏两种疟原虫的超微结构基本相似, 均位于 RBC 内(Fig 1A, Plate 2), 形状较规则, 多为圆或椭圆形, 外周有两层轻微波浪形的单位膜(统称限制膜); 其外层为纳虫泡膜, 内层为质膜, 两膜间有狭小的间隙(外周隙)。单核或多核(裂殖期), 核周隙比外周隙稍宽, 常有间断性膨大, 尤其在核孔两侧; 核质密度明显低于胞浆。胞浆中有较丰富的核糖体, 呈散在分布。内质网较少, 呈细管或小泡状。线粒体多呈腊肠形, 无嵴, 内腔含无定形或细颗粒性基质。虫体表面有胞口, 但很少见, 而以变形

凹陷居多,食物泡较大;有时能见到体积小得多的消化泡紧靠其旁,其中的血红蛋白被消化后形成色素粒,分化完全的色素粒内含有一或二个长矩形的半透明晶体,外围单层包膜,这些基本结构的形态在发育过程中有程度不等的变化,有的阶段还出现某些特殊的亚细胞结构,如裂殖子有顶端复合体(其中的棒状体通常为槌形,但也见到过一次环形的棒状体),配子体有嗜铁体等。所见超微结构均与文献报道⁽¹⁾基本一致。

2 DCDG 治疗组 疟原虫整体及其内部各种细胞器的形态都有显著的变化,其变化速度和程度均随剂量而增加,3 mg·kg⁻¹组在给药后15 min即有明显变化。

2.1 滋养体 最先出现的变化是核周隙扩张(Fig 1B, Plate 2)。在扩大的核周隙中逐渐出现一些纤维和膜性内含物,进而在一定位置(多是近红细胞表面处)向外突出,变为一个由核膜、质膜和红细胞膜围成的泡体,泡内除少量稀疏的纤维和膜性成份外,主要为可能充满液体的空间(Fig 1C, Plate 2);泡体破损后,其内容物即排至血浆中。在核周隙扩张的同时,内质网小池明显扩大;损伤较重的,糙面内质网膜上附着的核糖体明显减少或消失;更严重者内质网膜已不能分辨(Fig 1D, E, F, Plate 2)。其次,食物泡的膜间隙也有所扩大,其包膜有的消失,有的增厚或呈现多层化,多层化的形式主要有两种,一种如随意缠绕的线绳(Fig 1D, Plate 2);另一种非常规则,像典型的髓鞘(Fig 1E, Plate 2)。后一种较少见,在这种结构的膜层之间还连有更细的微丝,有时也能看到一个食物泡上两种形式结合存在。随着食物泡膜的变化,较少见到刚分离的消化泡,色素粒减少,晶体分化常不完全,电子染色加深,颗粒形状不很规则,色素泡肿大,基质减少甚至变空;有时多个色素粒汇集一起,泡膜残缺,呈溶解趋势(Fig 1B, D, F, G, Plate 2)。有些大自噬泡中,可见到

少量不完整或变形的色素晶体(Fig 1F, Plate 2)。稍后,线粒体出现肿大,常从一端开始(Fig 1B)。在严重扩大的内腔中,颗粒性基质减少甚至完全丧失,有时也有少量纤维或膜性物质。到更晚阶段,线粒体严重变形,常弯曲盘旋成各种不规则的形状(Fig 1E, Plate 2),环绕食物泡或其他胞浆物质,但其双层包膜基本完好。

2.2 裂殖体 由于核较多,而且每个核周隙都有所扩大,再加上很多扩大的内质网,使胞体看上去象个多孔网状结构(Fig 1G)。已形成的大色素团,常从疟原虫表面突起,呈排出状,其中的色素晶体呈现溶解或变形(Fig 2B)。线粒体的扩张及变形比滋养体阶段更明显,胞口不活跃,其包膜呈溶解趋势(Fig 1G)。更严重者,疟原虫的外周隙明显变宽,其中游离着各种膜性物质,有的纳虫泡膜和质膜消失(Fig 1E)。在各种膜间隙扩张以及泡体形成和排出的同时,胞体内有形成分的密度相对增加(Fig 1D-F)。最后,整个疟原虫胞体严重脱水,固缩一团而死亡(Fig 2A, C, Plate 3)。在较大剂量组里,给药后2 h,即可见到死亡疟原虫。

2.3 游离裂殖子的变化与上述类似,如核周隙及内质网扩张,有些细胞器变形、肿大等,但程度较轻(Fig 2D, Plate 3)。可是裂殖体内的裂殖子变化仍然很剧烈(Fig 2C, Plate 3)。我们还见到一裂殖子的两个棒状体形状不一,一个为通常棒槌形,一个呈环状(Fig 2D, Plate 3)。

2.4 DCDG 对配子体超微结构的影响也很明显,但不如对无性体那么强;在较大剂量和较长时间作用之后,可见与无性体类似的变化,如核糖体密集成堆,各种膜间隙扩大,泡体形成,质膜崩解;嗜铁体形态不整,排列紊乱等;最后虫体也是固缩或裂解而死亡(Fig 2E, Plate 3)。

2.5 RBC 的变化与对照组无明显差异,

主要是胞浆中有少量大小不等的单膜泡状物或裂隙,可能是疟原虫受药物作用后的排出物或死亡虫体的残迹(Fig 1B, G, Fig 2B).

3 药物对照组 经 CQ 处理的疟原虫胞浆中形成很多较小而内容各异的单膜自噬泡,然后这些较小的汇集起来,围上双层共有包膜,组成一个更大的复合泡体(包括疟色素团)(Fig 2F, Plate 3),晚期逐渐崩解或排出;核质呈轻度凝集,青蒿素则引起部分膜结构损伤,色素积聚,退化产物汇集形成大自噬泡;线粒体肿大(Fig 2G, Plate 3),还有核质凝集等。而且,我们观察到的核质变化比膜结构的变化更早、更突出(Fig 2H, Plate 3)。

DISCUSSION

CQ 和 Art 引起的变化与文献^[2-5]相符。DCDG 引起的超微结构变化中,有些与之基本相同,例如食物泡膜多层化、某些外排性泡体的形成,以及色素粒的变化等。有些是同中有异,如 DCDG 引起线粒体肿胀变形的作用显得更强些;有些则有较大区别,如 DCDG 引起的自噬泡体与 CQ 引起的就很不相同,后者是由多数小自噬泡汇集而成,泡内主要是胞浆有形成分,泡体很大时仍在胞体之内;前者多由膜间腔扩大转变而成,泡内只有少量膜性或纤维性物质,其余大部分是空隙,由于泡体的增大伴随着整个胞体的浓缩,所以泡内空隙可能被外渗的液体所充满,因而较易外排,从而造成了有形成分浓缩,使整个虫体很快变成了固缩状态。Art 和 CQ 都能引起核质凝集,DCDG 不能引起此种变化,其主要作用机制可能是引起疟原虫内部膜系统的通透性改变,造成胞体脱水,进而引起电解质紊乱和代谢障碍而死亡。

由于线粒体极度肿胀以致崩溃,疟原虫的能量代谢受到破坏,这可能是疟原虫死亡的又一原因。至于线粒体肿胀是否因为其内腔积聚了较多镓离子之故,值得探讨。线粒体确有集中某些离子的能力^[6]。

DCDG 对疟原虫配子体和无性体都有作用,生理选择性较小,这是一个重要的优点。关于游离裂殖子中出现的环形棒状体,其形态与 Aikawa 在氨基喹啉的研究^[7]中所见相似。Aikawa 认为是棒状体发生了溶解,但其密度并未减低,我们在正常对照中也偶见过这种形状的棒状体。

ACKNOWLEDGMENTS 本文承滕翕和研究员审阅,本院电镜室给予技术协助。

REFERENCES

- 1 Yan GH, Wang GJ. An ultrastructural study of rodent malaria merozoites. *Acta Zool Sin* 1985; 31 : 236
- 2 Ladda RL. Morphologic observations of the effect of antimalarial agents on the erythrocytic forms of *P. berghei* in vitro. *Milit Med* 1966; 131 (Suppl) : 993
- 3 Warhurst DC, Hockley DJ. Mode of action of chloroquine on *Plasmodium berghei* and *P. cynomolgi*. *Nature* 1967; 214 : 935
- 4 Macomber PB, Sprinz H, Tousimis AJ. Morphological effects of chloroquine on *Plasmodium berghei* in mice. *Nature* 1967; 214 : 937
- 5 中医研究院中药所药理室. 青蒿素的药理研究. *新医药学杂志* 1979; 1 : 23
- 6 Giese AC. *Cell Physiology*. 4th ed. Philadelphia: WB Saunders Company, 1973 : 103-108
- 7 Aikawa M, Beaudoin RL. Morphologic effects of 8-amino-quinolines on the exo-erythrocytic stages of *Plasmodium fallax*. *Milit Med* 1969; 134 (Suppl) : 986